

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

JP0305NIT

原本（出願用） - 印刷日時 2003年12月22日（22.12.2003）月曜日 12時30分01秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	JP0305NIT
I	発明の名称	眼科用治療組成物
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	株式会社 日本点眼薬研究所
II-4en	Name	NIHON TENGANYAKU KENKYUSHO CO., LTD.
II-5ja	あて名:	457-0039 日本国 愛知県 名古屋市 南区西桜町 7 6
II-5en	Address:	76, Nishisakura-cho, Minami-ku Nagoya-shi, Aichi 457-0039 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	052-822-5809
II-9	ファクシミリ番号	052-825-0340

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年12月22日（22. 12. 2003）月曜日 12時30分01秒

JP0305NIT

III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	すべての指定国 (all designated States)
III-1-4j a	氏名 (姓名)	西田 輝夫
III-1-4e n	Name (LAST, First)	NISHIDA, Teruo
III-1-5j a	あて名:	755-0152 日本国 山口県 宇部市 あすとぴあ 6-8-4
III-1-5e n	Address:	6-8-4, Asutopia Ube-shi, Yamaguchi 755-0152 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-2	その他の出願人又は発明者	
III-2-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-2-4j a	氏名 (姓名)	上竹 順久
III-2-4e n	Name (LAST, First)	UETAKE, Yorihiisa
III-2-5j a	あて名:	457-0039 日本国 愛知県 名古屋市 南区西桜町 7 6 番地 株式会社日本点眼薬研究所内
III-2-5e n	Address:	c/o NIHON TENGANYAKU KENKYUSHO CO., LTD. 76, Nishisakura-cho, Minami-ku Nagoya-shi, Aichi 457-0039 Japan
III-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-2-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-3	その他の出願人又は発明者	
III-3-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-3-4j a	氏名 (姓名)	岩田 浩明
III-3-4e n	Name (LAST, First)	IWATA, Hiroaki
III-3-5j a	あて名:	486-0846 日本国 愛知県 春日井市 朝宮町 3-3-10 シャルマン朝宮 B-101
III-3-5e n	Address:	B-101, Sharuman Asamiya 3-3-10, Asamiya-cho Kasugai-shi, Aichi 486-0846 Japan
III-3-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-3-7	住所 (国名)	日本国 JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

JP0305NIT

原本（出願用） - 印刷日時 2003年12月22日（22. 12. 2003）月曜日 12時30分01秒

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	小林 洋平
IV-1-1en	Name (LAST, First)	KOBAYASHI, Youhei
IV-1-2ja	あて名:	511-0821 日本国 三重県 桑名市 矢田 2 6 1 番地 6 号
IV-1-2en	Address:	261-6, Yada Kuwana-shi, Mie 511-0821 Japan
IV-1-3	電話番号	0594-21-2932
IV-1-4	ファクシミリ番号	0594-21-2933
IV-1-5	電子メール	yohe-k@f3.dion.ne.jp
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及びハアレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS KE KG KP KR KZ LC LG LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年12月22日（22. 12. 2003）月曜日 12時30分01秒

JP0305NIT

VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	出願日	2002年12月27日 (27. 12. 2002)	
VI-1-2	出願番号	2002-381131	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA A)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て（米国を指定国とする場合）	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書（申立てを含む）	5	-
IX-2	明細書（配列表を除く）	16	-
IX-3	請求の範囲	1	-
IX-4	要約	1	EZABST00.TXT
IX-5	図面	1	-
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数（明細書の配列表を除く）	24	
IX-6	明細書の配列表	1	-
IX-7	合計	25	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-9	個別の委任状の原本		-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表		
IX-16-(ii)	規則13の3に基づき提出する国際調査のための写しを含む追加的写し	-	1 フレキシブルディスク
IX-16-(iii)	国際調査のための写しの同一性、又は第IX欄に記載した配列表部分を含む写しの同一性についての陳述書を添付	✓	-
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
IX-19	要約書とともに提示する図の番号		
IX-20	国際出願の使用言語名:	日本語	
X-1	提出者の記名押印		
X-1-1	氏名 (姓名)	小林 洋平	

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
------	------------------------	--

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

JP0305NIT

原本（出願用） - 印刷日時 2003年12月22日（22. 12. 2003）月曜日 12時30分01秒

10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

## 明 細 書

### 眼科用治療組成物

#### 技術分野

- 5 本発明は、眼科用治療組成物に関するものである。

#### 背景技術

- 10 本発明は、フィブロネクチンの活性発現部位であるプロリンーヒスチジンーセリンーアルギニンーアスパラギン、及びこのアミノ酸配列の両末端を修飾した化学物質（以下、P H S R N又はAc-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>とする）に関するものである。また、この物質についての医薬として許容される塩類を有効成分とする眼科用治療組成物、または／及び予防組成物に関するものである。この組成物は、特に角膜上皮の創傷治癒促進作用を有する角膜障害の予防剤、または／及び治療剤に関するものである。

- 15 角膜は、厚さ0.52mm～1.0mmの薄い組織である。角膜は、眼球の最前線に位置しており、外界からの光を網膜における受容体へ導くために透過性と適切な屈折力を有する高度に分化した組織である。また、角膜は、生理学上極めて重要な機能を有している。角膜の構造は、比較的単純ではある。すなわち、角膜は、上皮層、ボーマン膜、角膜実質層、デスメ膜及び内皮細胞層からなる非常に規則  
20 正しく微細な5重構造を有している。

- フィブロネクチンは、細胞の接着や伸展に関与する分子量約44万の糖蛋白であり、創傷治癒作用に加えて、形態形成や発生など生物現象で重要な役割を演じている。このフィブロネクチンは、分子量22万～25万のサブユニットが2個結合したダイマー（2量体）である。フィブロネクチンはドメイン構造を備えている。フィブロネクチンは、特異的に種々の細胞外基質と結合し、細胞表面のフ  
25 イブロネクチン受容体（インテグリン）との橋渡しをすることにより細胞の接着

に關与している。

角膜障害は、角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の種々の疾患により引き起こされる。この障害は、混合感染の併発がない場合には、自然に修復する。その修復原理としては、①角膜が障害を受けると、上皮欠損部の露出した角膜実質部にフィブロネクチンが出現する、②このフィブロネクチンがマトリックスに接着する、③このマトリックスに上皮細胞が伸展・移動する、というものである。角膜が治癒していくにつれて、フィブロネクチンは角膜障害部から消失していく。

何らかの理由で修復が遅延したり、あるいは修復が行われずに上皮欠損が遷延化することがある。すると、上皮の正常な構築に悪影響を与えることに加え、実質・内皮の構造や機能まで害される。従来の治療法は、外界の刺激から角膜表面を保護することにより、自然に上皮が伸展して欠損部の再被覆をはかるという受動的なものである。近年、細胞生物学の発展に伴い、細胞の分裂・移動・接着・伸展等に関与する因子が解明されてきている。角膜上皮欠損の修復には、角膜上皮の伸展を促進する化合物が重要視されてきている。

角膜上皮創傷の治療剤として知られているものとして、フィブロネクチン、E G F (Epidermal Growth Factor)、ヒアルロン酸等の成分がある。人の血漿中に存在するフィブロネクチンを精製して、点眼用の血液製剤として用いることができる。この点眼剤により、角膜上皮欠損の再被覆が促進され、上皮創傷治癒が促進されることが知られている。

しかしながら現在のところ、フィブロネクチンは、患者自身の血漿を用いて、特殊な精製キットを用いて精製しなければならない。このため、フィブロネクチンを得るには、非常に手間がかかり、患者にとっては大きな負担となっている。この理由により、フィブロネクチンは臨床的には有効であるものの、充分には活用されるに至っていない。

E G F (Epidermal Growth Factor) は、分子量 6 0 0 0 のポリペプチドであり、

角膜上皮分裂増殖因子としての作用が知られている。上皮の分裂を抑制する因子が存在している場合は、EGFの効果が発揮し難いことが知られている。加えて、炎症を伴う例や糖尿病性角膜症では、EGFの副作用として、血管新生が発生するという問題点を有している。

- 5        ヒアルロン酸は、N-アセチル-D-グルコサミンとD-グルクロン酸を構成糖とする分子量数百万のグルコサミノグリカンである。ヒアルロン酸は、ドライアイの治療剤として顕著な治療効果を示すことが知られている。ヒアルロン酸の作用は、主として、上皮細胞の接着・進展・移動に働くものであり、上皮細胞の増殖効果は弱い。ヒアルロン酸は、高濃度となると粘度が増すため、点眼剤としては
- 10      使用しにくいという欠点がある。

- ところで、ペプチドPHSRNは、国際公開公報WO98 / 22617号、及びThe Journal of Clinical Investigation, 105(11), p1537-1545, 2000, The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice に開示されているペンタペプチドである。これ
- 15      らの先行技術文献中には、ペプチドPHSRNが、外傷治癒及びがん細胞浸潤・増殖抑制効果を有すると記載されている。しかし、ペプチドPHSRNについての眼科領域に関する報告は知られていない。

このように、角膜障害治療組成物として、満足できるものは知られておらず、更に優れた組成物が強く望まれていた。

- 20      前述のように、フィブロネクチンは、眼科領域において臨床的には有効であると認識されている。しかし、フィブロネクチンは、血液製剤に特有の問題（例えば、衛生面の問題、患者自身が血液を採取するという負担の大きさ、及び血漿からフィブロネクチンを精製するという煩雑さ等）を有しているために、広く使用されるには至っていない。加えて、フィブロネクチンの活性部位は、充分には明
- 25      らかにされていないことから、フィブロネクチンを角膜障害治療剤の有効成分として用いるには、更なる研究開発の余地が残されていた。



本発明は、以上のような事情の下でなされたものであり、一つの目的は、フィブロネクチンの活性発現部位を見いだすことであり、他の目的は、フィブロネクチンの活性発現部位を眼科用治療薬または／及び予防薬として使用できる組成物を提供することである。

5

#### 発明の開示

以上のような目的を達成すべく、本発明者らは、フィブロネクチンに含まれるペプチドに着目し、角膜障害に対する作用を検討した。その結果、本発明者らは、フィブロネクチンの活性発現部位である P H S R N が、角膜上皮の創傷治癒を促進することを見い出した。

すなわち、本発明者らは、① P H S R N の眼科用治療組成物としての新しい用途を見い出し、②角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の予防剤または／及び治療剤として、P H S R N、またはその医薬として許容される塩類を用いる組成物が有用であることを見い出し、基本的には本発明を完成した。

こうして、本発明は、角膜障害に対して、少量で強い治療効果を示し、かつ低分子で安全性に優れる新規な眼科治療用組成物を提供するものである。

より具体的には、本発明においては以下のようなものを提供する。

(1) ペプチド P H S R N、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類を有効成分として含有する眼科用治療組成物。

(2) ペプチド P H S R N、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類を有効成分とする角膜障害予防剤または／及び治療剤。

(3) 角膜障害が角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイである(2)記載の角膜障害予防剤または／及び治療剤。

(4) 剤型が点眼剤である(3)記載の角膜障害予防剤または／及び治療剤。

(5) ペプチド P H S R N またはこのペプチドについての医薬として許容され

る塩類を有効成分とする角膜上皮伸展促進剤。

(6) 剤型が点眼剤である (5) 記載の角膜上皮伸展促進剤。

(7) 有効量のペプチド P H S R N またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類の使用及びこれらによる角膜障害治療方法。

5     なお、本明細書中において、アミノ酸残基については、次のような省略記号を用いる。つまり、アスパラギンは Asn または N を、アルギニンは Arg または R を、ヒスチジンは His または H を、プロリンは Pro または P を、セリンは Ser または S を意味する。また、Ac はアセチル基を、NH<sub>2</sub> はアミノ基を意味する。

10     ペプチド P H S R N は、フィブロネクチンの活性部位であるペプタペプチド、Pro-His-Ser-Arg-Asn の構造を有するものである。上記アミノ酸は多数の鏡像異性体を生じ得る場合、これらすべての鏡像体及びそれらの混合物はすべて本発明に含まれるものである。ペプチド P H S R N をモチーフとして形成された組成物については、均等の範囲として本発明の権利範囲に解釈されるべきである。また、  
15     ペプチド P H S R N において、N 末端側をアセチル化し、C 末端側をアミド化した物質、つまり Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> が好ましい。

本発明でいう予防または／及び治療とは、ヒトを含む動物に投与することにより、疾病の発生を未然に防ぐこと（予防）または、疾病に罹った患者を治すこと（治療）を意味している。

20     本発明でいう角膜障害とは、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ等をいう。

ペプチド P H S R N についての医薬として許容される塩類としては、例えば塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等が挙げられる。

25     ペプチド P H S R N、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類は、経口的、または非経口的に投与することができる。投与剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、注射剤、点眼剤等が挙げられる。このうち、特

に点眼液、眼軟膏等の点眼剤が好ましい。これらは汎用されている技術を用いて製剤化することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等の経口剤であれば、乳糖、結晶セルロース、デンプン、植物油等の賦形剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の崩壊剤、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マクロゴール、シリコン樹脂等のコーティング剤、ゼラチン皮膜等の皮膜剤などを必要に応じて加えればよい。また、点眼液であれば、塩化ナトリウム等の等張化剤、リン酸ナトリウム等の緩衝化剤、塩化ベンザルコニウム等の防腐剤等を用いて製剤化することができる。これらの医薬のpHは、眼科製剤に許容される範囲内にあればよいが、4～8の範囲が好ましい。眼軟膏であれば、白色ワセリン、流動パラフィン等の汎用される基剤を用いて調製することができる。

また、本発明の角膜障害治療剤は、局所投与、特に点眼剤として投与することが好ましい。点眼剤におけるペプチドPHSRNの濃度は、症状、年齢等に応じて設定すれば良く、特に限定する必要はないが、0.00001%～1%が好ましい。投与量としては、点眼液を例にとると、1回1滴～数滴、1日1回～数回投与することができる。点眼剤としては、通常点眼液のほか、用時溶解型の点眼液や眼軟膏としてもよい。製剤化については通常技術、すなわち塩化ナトリウム、塩化カリウム等の等張化剤、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等の緩衝剤、エデト酸ナトリウム等の安定化剤、エチルパラベン、ブチルパラベン、塩化ベンザルコニウム等の防腐剤、水酸化ナトリウム、希塩酸等のpH調整剤、白色ワセリン、流動パラフィン等の眼軟膏用基剤等の添加物を必要に応じて加え、常法により製剤化することができる。

本発明に係るペプチドPHSRNは、例えば不溶性の高分子担体上でペプチド鎖をC末端から伸長していく固相法、または担体を用いない液相法などの通常のペプチド合成で用いられる方法によって容易かつ安価に製造することができる。

本発明の眼科用剤を工業的に生産するために、本発明に係るペプチドPHSRNを使用すること、及びこれを用いて患者に投与する治療方法も本発明の適用範囲に含まれる。

## 5 図面の簡単な説明

第1図は、ペプチドPHSRNの角膜上皮細胞の伸展に与える効果を示すグラフである。横軸は、ペプチドPHSRNの濃度（0（コントロール）、51.2 nM、102.5 nM、153.7 nM、256.2 nM、512.3 nM）を示し、縦軸は、角膜上皮の伸展長（ $\mu\text{m}$ ）を示した。

10

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、ペプチドPHSRNの有用性を調べるために、角膜障害に対するペプチドPHSRNの影響を検討した。詳細は、後述の薬理試験の項で示した。本発明者らは、ペプチドPHSRNの点眼が、①角膜片の組織培養系における角膜上皮の伸展効果、及び②角膜上皮剥離後の創傷治癒を促進する効果を有することを見出した。このことから、ペプチドPHSRNは、角膜障害（すなわち、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ等、特に角膜上皮剥離）、及びドライアイの治療に有用であることが明らかとなった。

15

次に、本発明の製剤例および薬理試験の結果を説明するが、本発明の技術的範囲は、下記の実施形態によって限定されるものではなく、その要旨を変更することなく、様々に改変して実施することができる。また、本発明の技術的範囲は、均等の範囲にまで及ぶものである。

20

### 1. 製剤例

25

#### 1) 点眼液

処方1として、全量100ml中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>を0.01g、塩化

ナトリウムを 0.9g、及び滅菌精製水を適量含む点眼液を調整する。また、処方 1 と同様に、全量 100ml 中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> が、各々 0.00001g, 0.00003g, 0.0001g, 0.0005g, 0.001g, 0.005g, 0.05g, 0.1g 含まれる点眼液を調製することができる。

- 5 処方 2 として、全量 100ml 中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> を 0.1g、塩化ナトリウムを 0.8g、リン酸水素ナトリウムを 0.1g、リン酸二水素ナトリウムを適量、及び滅菌精製水を適量含む点眼液を調整する。また、処方 2 と同様に、全量 100ml 中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> が、各々 0.00001g, 0.00003g, 0.0001g, 0.0005g, 0.001g, 0.005g, 0.05g, 0.1g 含まれる点眼液を調製することができる。

10 2) 眼軟膏

処方 3 として、全量 100g 中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> を 0.05g、白色ワセリンを 90g、及び流動パラフィンを適量含む眼軟膏を調整することができる。また、処方 3 と同様に、全量 100g 中に、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> が、各々 0.00001g, 0.00003g, 0.0001g, 0.0005g, 0.001g, 0.005g, 0.05g, 0.1g 含まれる眼軟膏を調製することができる。

15 2. 実施例

固相法により Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> を合成した。この化合物を用いて、①in vitro における角膜上皮伸展作用、及び②in vivo における角膜創傷治癒促進作用を検討した。詳細なデータは薬理試験の項に記載した。

- 20 Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> を加えた群では、コントロール群と比較すると、明らかに角膜上皮細胞層が伸展し、また角膜の創傷が早く治癒した。このことから、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> が、角膜障害の治療剤として有用であることが立証された。

3. 薬理試験

- 25 ①角膜上皮伸展に対する作用 (in vitro)

雄性日本白色ウサギの角膜を用い、Nishida らの方法 (J. Cell. Biol., 97, 1653

—1657 (1983)) に準じ、角膜片の組織培養系での角膜上皮伸展長を指標にして角膜上皮伸展に対する影響を検討した。

(実験方法)

ウサギ角膜片より角膜ブロック (1 群 3 個) を切り出した。この角膜ブロックを被験化合物を含む培養液 (Medium-199) 中、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で、20 時間培養した。培養後、角膜ブロックをエタノール-氷酢酸 (容積比 95 : 5) 混合液中で固定し、パラフィンで包埋して切片を作製した。切片を脱パラフィンした後、ヘマトキシリン-エオジン染色し、顕微鏡で上皮細胞層の伸展長を測定した。コントロールとして、被験化合物を含まない培養液で同様に培養したものを用いた。

(結果)

図 1 に示すように、Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> を含む培養液で培養をすると、角膜上皮の伸展に対して顕著な促進が認められた。

②角膜創傷治癒促進作用 (1) (in vivo)

雄性日本白色ウサギを用い、Cintron らの方法 (Ophthalmic Res., 11, 90-96 (1979)) に準じて角膜上皮剥離を起こさせ、角膜に直径約 6mm の創傷を作成した。創傷面積は、フルオレセイン染色面積を指標として測定した。被験化合物の角膜創傷治癒に対する影響を検討した。

(実験方法)

角膜上皮剥離を起こさせた後、0、3、6、9、12、18、24、27、30、33、36、42 及び 48 時間後に各濃度の被験化合物を含む点眼液を点眼 (30  $\mu$ L/回) した。創傷面積を測定する際に、フルオレセイン染色を行い角膜の写真を測定した。撮影した角膜のフルオレセイン染色面積は、画像解析処理システムを用いて算出した。コントロールとして、被験化合物を含まない基剤 (PBS) を点眼したウサギを用いた。

(結果)

下記表 1 及び表 2 は、ウサギ角膜損傷モデルにおける

Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub> (PHSRN) に対する治癒後効果を治癒率で示したものである。表 1 及び表 2 に示す通り、ペプチド PHSRN の点眼は、創傷治癒に対して顕著な促進を示すことが認められた。

表 1 及び表 2 において、各値は平均値±標準偏差を示す (n=6)。統計解析は、  
5 PBS に対する Dunnett の多重比較を用い、角膜上皮剥離直後 (0 時間) の角膜損傷部位の面積を 100% とした (\*p<0.05、\*\*p<0.01 ; v. s. コントロール)。

くウサギ角膜損傷モデルに対するPHSRNに対する治癒後効果（治癒率）＜

表 1

治癒率 (%)	0hr	6hr		12hr		24hr	
PBS	0	4.96±3.28		19.14±5.04		54.36±9.00	
2 μ M PHSRN	0	9.66±2.21 <sup>*</sup>		26.71±2.62 <sup>**</sup>		61.91±3.08	
20 μ M PHSRN	0	10.73±3.21 <sup>**</sup>		28.01±1.92 <sup>**</sup>		64.07±3.98 <sup>*</sup>	
200 μ M PHSRN	0	11.06±3.50 <sup>**</sup>		28.69±4.10 <sup>**</sup>		67.70±5.37 <sup>**</sup>	
2000 μ M PHSRN	0	11.15±1.25 <sup>**</sup>		28.99±2.65 <sup>**</sup>		69.49±3.17 <sup>**</sup>	
5 μ M EGF	0	14.49±3.42 <sup>**</sup>		31.63±1.29 <sup>**</sup>		70.78±6.91 <sup>**</sup>	



表 2

＜ウサギ角膜損傷モデルに対するPHSRNに対する治癒後効果（治癒率）＞

治癒率 (%)	36hr	48hr
PBS	84.49 ± 11.60	97.09 ± 5.98
2 μ M PHSRN	88.08 ± 4.03	99.14 ± 1.90
20 μ M PHSRN	89.09 ± 6.42	99.15 ± 1.52
200 μ M PHSRN	94.97 ± 4.63 <sup>*</sup>	100.00 ± 0.00
2000 μ M PHSRN	95.39 ± 3.06 <sup>*</sup>	100.00 ± 0.00
5 μ M EGF	96.41 ± 3.97 <sup>*</sup>	99.58 ± 1.03

③角膜創傷治癒促進作用 (2) (in vivo)

上記②と同様の方法を用いて、日本白色ウサギを用い角膜上皮剥離を起こさせ、

- 5 角膜に直径約 8mm の創傷を作成した。創傷面積をフルオレセイン染色面積を指標

として測定し、角膜創傷治癒に対する影響を検討した。

(実験方法)

5 角膜上皮剥離を起こさせた後、0、6、12、18、24、30、36、42、48 及び 54 時間後に各濃度の被験化合物を含む点眼液を点眼 ( $25 \mu\text{L}/\text{回}$ ) した。創傷面積を測定する際に、フルオレセイン染色を行い角膜の写真を測定した。撮影した角膜のフルオレセイン染色面積は、画像解析処理システムを用いて算出した。コントロールとして、被験化合物を含まない基剤 (生理食塩水) を点眼したウサギを用いた。

(結果)

10 下記表 3 及び表 4 は、ウサギ角膜損傷モデルにおける  $\text{Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH}_2$  (PHSRN) に対する治癒後効果を治癒率で示したものである。表 3 及び表 4 に示す通り、ペプチド PHSRN の点眼は、創傷治癒に対して顕著な促進を示すことが認められた。

15 表 3 及び表 4 において、各値は平均値  $\pm$  標準偏差を示す ( $n=6$ )。統計解析は、生理食塩水に対する Dunnett の多重比較を用い、角膜上皮剥離直後 (0 時間) の角膜損傷部位の面積を 100% とした ( $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$  ; v. s. コントロール)。

くウサギ角膜損傷モデルにおけるPHSRNに対する治癒後効果（治癒率）>

表 3

治癒率（%）	0hr	12hr		18hr		24hr		30hr	
生理食塩水	0	8.27±3.38		23.12±4.05		52.71±5.36		52.71±5.36	
0.3%ヒアルロン酸	0	13.98±4.88 <sup>*</sup>		28.45±3.37 <sup>*</sup>		60.78±8.07 <sup>**</sup>		60.78±8.07 <sup>*</sup>	
0.04% PHSRN	0	13.57±3.74 <sup>*</sup>		29.45±3.29 <sup>**</sup>		58.71±6.32 <sup>**</sup>		58.71±6.32 <sup>**</sup>	

くウサギ角膜損傷モデルにおけるPHSRNに対する治癒後効果（治癒率）＞

治癒率（％）	36hr		48hr		54hr		72hr	
生理食塩水	65.63±6.69		87.06±7.72		94.46±6.50		99.72±0.80	
0.3% ヒアルロン酸	71.62±11.02		90.19±9.51		95.35±6.44		99.92±0.22	
0.04% PHSRN	70.29±8.38		88.27±8.74		94.24±6.62		98.93±2.16	

#### 発明の効果

上記の薬理試験から、フィブロネクチンの最小活性発現部位であるペプチド PHSRN が、角膜上皮の創傷治癒促進作用を有していること、及び種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の予防剤または／及び治療剤として有用であること、が見出された。

請 求 の 範 囲

1. ペプチドPHSRN、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類を有効成分とする眼科用治療組成物。
2. ペプチドPHSRN、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類を有効成分とする角膜障害予防剤または／及び治療剤。
- 5 3. 角膜障害が角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイである請求項2記載の角膜障害予防剤または／及び治療剤。
4. 剤型が点眼剤である請求項2記載の角膜障害予防剤または／及び治療剤。
5. 剤型が点眼剤である請求項3記載の角膜障害予防剤または／及び治療剤。
- 10 6. ペプチドPHSRN、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類を有効成分とする角膜上皮伸展促進剤。
7. 剤型が点眼剤である請求項6記載の角膜上皮伸展促進剤。
8. 有効量のペプチドPHSRN、またはこのペプチドについての医薬として許容される塩類の使用及びこれらによる角膜障害治療方法。

要 約 書

フィブロネクチンの最小活性発現部位を見い出し、その最小単位の眼科領域についての作用を解明し、これを有効成分とする眼科用治療組成物を提供することを目的とする。本発明は、ペプチド P H S R N (Pro-His-Ser-Arg-Asn)、及びその誘導体である Ac-Pro-His-Ser-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>、または、その医薬として許容される塩類を有効成分とする眼科用治療組成物、特に角膜障害治療剤である。また、好ましい剤型は点眼剤である。

1/1

## SEQUENCE LISTING

<110> NIHON TENGANYAKU KENKYUSHO CO.,Ltd.

<120> Ophthalmological composition

5

<130> JP0305NIT

<150> JP2002-381131

<151> 2002-12-27

10

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> partial sequence in Fibronectin

<400> 1

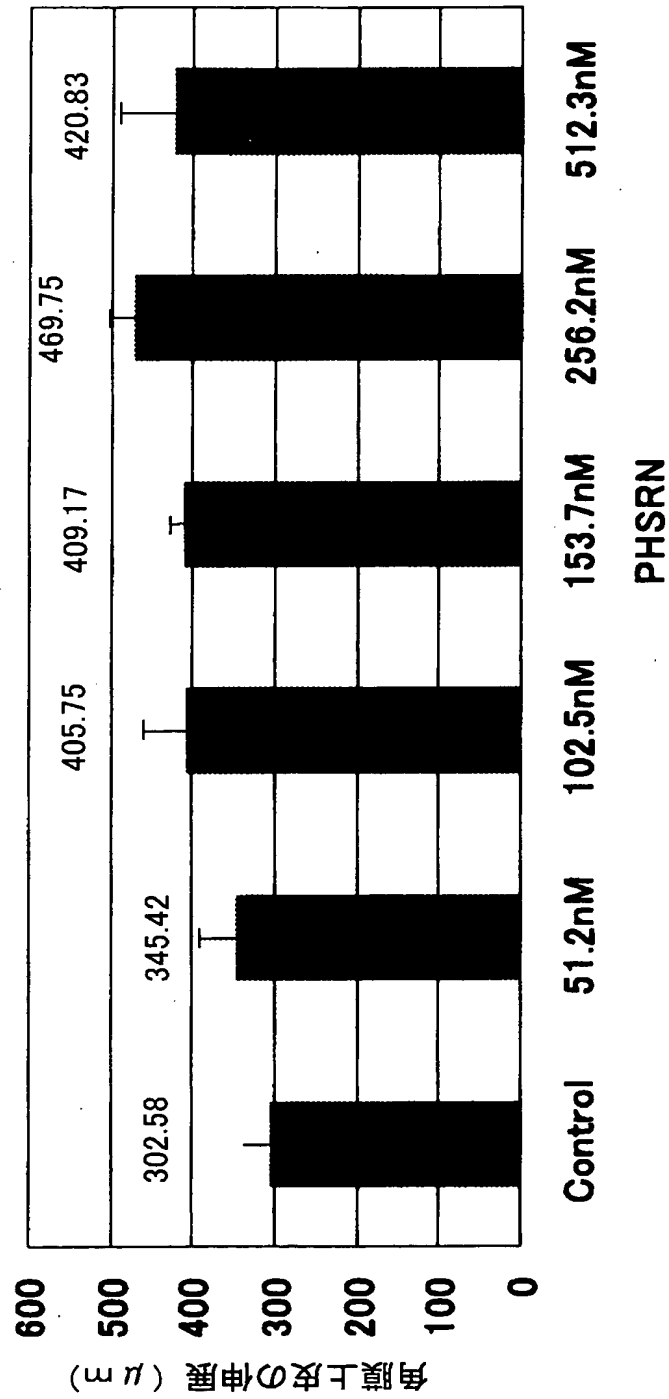
25 Pro His Ser Arg Asn

1

5



第1図



PHSRNによる角膜上皮細胞の伸展の効果